



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Off nlegungsschrift
⑩ DE 195 20 792 A 1

⑤① Int. Cl. 6:
A 61 K 31/195

②① Aktenzeichen: 195 20 792.0
②② Anmeldetag: 7. 6. 95
②③ Offenlegungstag: 12. 12. 96

BEST AVAILABLE COPY

DE 195 20 792 A 1

⑦① Anmelder:
Bloch, Wilhelm, Dr., 55435 Gau-Algesheim, DE;
Michel, Olaf, Dr., 50859 Köln, DE

⑦② Erfinder:
Antrag auf Nichtnennung

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
DE 31 37 280 A1
DE 24 16 339 A1
DE-OS 24 03 182
WO 93 21 941 A1
ADOLPHSON, R.L. et al.: Int. J. Immunopharmacol.,
Vol. 9, No. 1 (1987) S. 51-60;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verwendung der Stickstoffmonoxidsynthese hemmenden Substanzen der Gruppe der L-Argininanalogue zur Herstellung eines Mittels zur Abschwellung entzündlich bzw. allergisch angeschwollener Nasenschleimhaut und der Hemmung entzündlich und allergisch bedingter Nasensekretion

⑤⑦ Die bisher verwendeten Substanzen zur Abschwellung der Nasenschleimhaut und Reduktion der Nasensekretion bei entzündlichen und allergischen Erkrankungen führen zu einer Austrocknung der Nasenschleimhaut, auch bei nicht veränderter Nasenschleimhaut. Mittels Substanzen aus der Gruppe der NO-Synthesehemmer soll eine weitgehende Abschwellung entzündlich und allergisch alterierter Nasenschleimhaut erreicht werden, ohne Unterdrückung der basalen physiologischen Durchblutung. Die, die NO-Bildung hemmenden Substanzen, die unter anderem durch Oberflächenapplikation verabreicht werden können, reduzieren durch Unterdrückung der NO-Bildung die bei entzündlichen und allergischen Prozessen gesteigerte Durchblutung der Nase und führen dadurch zu einer Abschwellung der Nasenschleimhaut und zu einer Abnahme der Nasensekretion. Unter basalen physiologischen Bedingungen kommt es zu einer wesentlichen Durchblutungs- und Sekretionsminderung der Nasenschleimhaut. Die Substanzgruppe eignet sich zur Abschwellung der Nasenschleimhaut und Reduktion der Nasensekretion bei entzündlichen und allergischen Veränderungen der Nasenschleimhaut.

DE 195 20 792 A 1

Stand der Technik

1. Die Anschwellung der Nasenschleimhaut und die Inhibition der Nasensekretion wird derzeit vor allem mittels Sympathomimetika durchgeführt, die eine vorwiegend Alpha-adrenerge Wirkung zeigen. Dabei spielt die Drosselung des Blutzufusses, sowie die Engstellung der endonasalen Schwellkörper in den Nasenmuscheln, insbesondere in der unteren Nasenmuschel, über eine Veränderung des Kontraktionszustands der glatten Gefäßmuskulatur eine wesentliche Rolle (Cauna and Cauna, 1975; Grevers, 1994). Weiterhin werden für eine erhöhte Nasensekretion Veränderungen im Bereich der Kapillaren der Nasenschleimhaut verantwortlich gemacht (Grevers, 1993). Bisher besteht jedoch über die komplexen funktionellen Zusammenhänge in Verbindung mit den morphologischen Besonderheiten dieser Strukturen keine endgültige Klarheit, die den Schwellvorgang innerhalb der Nasenschleimhaut erklären könnte (Grevers, 1994). Insbesondere ist nicht klar, welche Mediatoren in die Regulation der Schwellung der Nasenschleimhaut und der Nasensekretion eingeschaltet sind.

Neben den bekannten Mediatoren, wie z. B. Bradykinin (Baraniuk et al., 1994) und Histamin (Greiff et al., 1994) gibt es vermehrt Hinweise auf das Vorhandensein eines weiteren Mediators z. B. des Stickstoffmonoxid in der Nasenschleimhaut (nähere hierzu unter 3.).

2. Stickstoffmonoxid (NO) ist an einer Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Regulationsvorgängen im menschlichen Körper beteiligt. Darunter fallen seine vasoregulative Funktion, seine neuroregulatorische Kapazität, seine sekretionregulierende Funktion und die Bedeutung für unspezifische Abwehrvorgänge (zum Überblick: Moncada et al., 1991; Kerwin and Heller, 1994; Shaul et al., 1994). Dabei spielt NO vor allem an den Gefäßen eine wichtige Rolle als stärkster Vasodilatator, der über eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase zu einer Relaxation der glatten Muskulatur führt. Die NO-Bildung wird vor allem, dem im Endothel lokalisierten Enzym NO-Synthase zugeschrieben (Palmer et al., 1987).

Darüberhinaus konnte jedoch auch nachgewiesen werden, daß NO-bildende Nervenfasern eine Rolle bei der Vasodilatation spielen können (Toda et al., 1993).

Neben diesen beiden Quellen für die NO-Bildung, bei denen es sich um Calcium-Calmodulinabhängige Isoformen der NO-Synthase handelt (Förstermann et al. 1991), kann eine weitere Form der NO-Synthase, die nicht Calcium-Calmodulinabhängig ist bei inflammatorischen Reaktionen eingeschaltet werden. Insbesondere für generalisierte inflammatorische Prozesse, wie dem Endotoxinschock wird die Expression dieses Isoenzym in einer ganzen Reihe von Zelltypen (z. B. Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, glatten Muskelzellen, Epithelzellen und Endothelzellen) innerhalb weniger Stunden beschrieben (for review Kerwin and Heller, 1994). Aber nicht nur für generalisierte Prozesse auch für lokale inflammatorische und allergische Prozesse kann ein Auftreten der NO-Synthase (Hamid et al. 1993) und eine verstärkte Bildung von NO (Alving et al. 1993; Persson and Gustafsson, 1993; Khgaitonov et al. 1994) gefunden werden.

Hier stehen vor allem die unteren Atemwege im Mittelpunkt des Interesses, da Messungen von NO in der

Ausatemluft bei asthmatischen Erkrankungen eine Zunahme des NO-Gehalts zeigen. Als Quelle für die NO-Bildung werden die unter physiologischen Bedingungen schon vorhandenen constitutiven NO-Synthasen, in NO-synthasehaltigen Nervenfasern und im Gefäßwandendothel der pulmonalen Gefäße, sowie die durch Induktion exprimierte Calcium-Calmodulinunabhängige Isoform, verantwortlich gemacht (Kharitonov et al., 1994). Die Expression dieser NO-Synthase führt zu einer vielfach gesteigerten NO-Freisetzung. Quelle dieser NO-Bildung können vor allem das Bronchialepithel (Hamid et al. 1993) und Makrophagen (Kawabe et al., 1992), aber auch andere Zelltypen sein.

3. In den letzten beiden Jahren ergaben sich zunehmend Hinweise auf das Vorhandensein von NO-Synthase in der Schleimhaut der Nase. Hier konnte mittels NADPH-Diaphorase staining (einer histochemischen Methode zur Lokalisation der NO-Synthase) und des neuronalen NO-Synthaseantikörpers eine neuronale Lokalisation in Nervenfasern, die die Nasenschleimhaut versorgen gefunden werden (Hanazawa et al., 1993; Kishimoto et al., 1993). Untersuchungen von Lundberg et al. 1995 zeigen, daß insbesondere die Nasennebenhöhlen eine Quelle für die NO-Bildung unter physiologischen Bedingungen darstellen, da hier die induzierbare NOs auch unter physiologischen Bedingungen vorkommt, während die Nasenschleimhaut im Bereich der Nasenhöhle nur sehr wenig Expression für die iNOS unter physiologischen Bedingungen zeigt. In diesem Zusammenhang konnten eigene neue Untersuchungen mittels NADPH-d und Immunhistochemie (eNOS und iNOS-Antikörper) zeigen, daß ein Expression von iNOS im Oberflächenepithel und in den Endothelien der Gefäße, erst auftritt oder verstärkt bei einer entzündlichen Veränderung der Schleimhaut, zu finden ist. Darüberhinaus zeigt sich eine Expression der iNOS in den mononukleären Rundzellen. Insgesamt kommt es zu einer deutlich verstärkten Expression von NOS in der Nasenschleimhaut unter inflammatorischen und allergischen Bedingungen.

Daß NO in der Nase auch unter physiologischen Bedingungen gebildet wird konnte von Alving et al. (1994) gezeigt werden, die von einer bevorzugten Herkunft des NOs in der Atemluft aus dem Bereich der oberen Atemwege unter physiologischen Bedingungen ausgehen.

Dies steht im Gegensatz zu anderen Autoren, die eine bevorzugte Herkunft des NOs in der Atemluft aus den unteren Atemwegen postulieren (Persson et al., 1993). Jüngste Untersuchungen von Lundberg et al. (1995) an 5 gesunden Probanden zeigen; daß die Nasennebenhöhlen unter physiologischen Bedingungen die Quelle für die NO-Freisetzung darstellen. Die Konzentrationen des sehr kurzlebigen NOs sind physiologisch in den Nasennebenhöhlen sehr hoch während in der Nasenhöhle wesentlich geringere Mengen gefunden werden.

Im Zusammenhang mit einer NO-vermittelten Schwellung der Nasenschleimhaut durch eine verstärkte Blutfüllung der Nasenschwellkörper ist die Regulation des Corpus cavernosum penis interessant, da strukturelle Ähnlichkeiten zwischen dem Schwellgewebe der Nasenschleimhaut und dem des Corpus cavernosum bestehen (Grevers and Herrmann, 1987). Beim Corpus cavernosum kommt es zu einer NO vermittelten Blutfüllung des Schwellkörpers (Kim et al., 1994). Dies wirft die Frage nach der Rolle von NO für die Schwellung der Nase und die Nasensekretion auf.

Eine Mitwirkung von Stickstoffmonoxid an der vasa-

len und neurovegetativen Regulation der Nase lassen eine Reihe von neueren Untersuchungen zur Lokalisation des NO-bildenden Enzyms NO-Synthase vermuten. Es konnte mit Hilfe von Antikörpern gegen die neuronale NOS und NADPH-d gezeigt werden, daß NOS in Nervenfasern der Regio respiratoria und der Regio olfactoria zu finden ist. Diese Nervenfasern sind in der Umgebung von Blutgefäßen, Drüsen und Oberflächenepithel zu finden (Hanazawa et al, 1993; Kulkarni et al, 1994). Darüberhinaus zeigte sich mittels NADPH-d auch eine Markierung von Oberflächenepithel, Drüsen und Riechepithel (Kulkarni et al, 1994), bei nicht mit dem neuronalen NOS-Antikörper markierbaren Zellen.

Inwieweit es sich dabei um andere Isoformen der NOS handelt, oder nicht NOS gekoppelte Enzyme, ist bisher nicht klar. Über die Verteilung der NOS im Endothel der Blutgefäße der Nasenschleimhaut gibt es bisher auch keine Literaturhinweise. Eigene Untersuchungen zur Verteilung von NOS in der menschlichen Nasenschleimhaut bestätigen die Befunde zur Lokalisation der neuronalen NOS und geben darüberhinaus einen Hinweis auf endotheliale NOS in den Gefäßen der Nasenschleimhaut. Darüberhinaus zeigen Untersuchungen mittels NADPH-d und einem Antikörper gegen die induzierbare NOS, daß bei entzündlichen Veränderungen in der Nasenschleimhaut, in mononukleären Rundzellen und im Oberflächenepithel, sowie in den Endothelzellen induzierbare NOS exprimiert wird. Dies zeigt eine mögliche Regulation der Nasenschleimhaut durch NO unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen auf. Insbesondere unter entzündlichen und allergischen Bedingungen kann es durch Expression der induzierbaren NOS zu einer, um das vielfache gesteigerten NO-Bildung kommen (Knowles et al, 1990). Bisher gibt es keine Untersuchungen zum Einfluß von NOS-Inhibitoren auf die Schwellung der Nasenschleimhaut und die Nasensekretion.

4. Die NO-Bildung erfolgt in einer von verschiedenen Cofaktoren abhängigen Reaktion durch Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin und NO. Als Cofaktoren sind NADPH, FAD, FMN und BH_4 notwendig. Als wirkungsvolle Hemmer der NO-Bildung haben sich eine Reihe von L-Argininanalogen gezeigt, die als stereoselektive kompetitive Hemmer der NO-Synthese dienen, (for review Kerwin und Heller, 1994) dazu gehört auch das N-Nitro-L-Arginin. Das zu einer Hemmung aller drei Isoformen der NOS führt, ohne daß eine Spezifität für eine der Isoformen erkennbar ist. Demgegenüber sind jedoch auch Substanzen bekannt, zu denen das L-Aminoguanidin gehört die eine stärkere Spezifität für die Calcium-Calmodulinunabhängige NOS haben (Misko et al, 1993).

Der Erfindung zugrundeliegendes Problem

Bei allergischen und entzündlichen Affektionen der Nasenschleimhaut kommt es zu einer Anschwellung der Nasenschleimhaut und einer Erhöhung der Nasensekretion. Für die Behandlung dieser Symptome werden bisher hauptsächlich Präparate aus der Gruppe der Alpha-Adrenergika verwendet, die jedoch bei Langzeitanwendung zu atrophischen Veränderungen in der Nasenschleimhaut führen. Diese Substanzen führen auch unter basalen physiologischen Bedingungen zu einer verschlechterten Durchblutung der Nase, die mit einer Austrocknung einhergeht. Es fehlen Substanzen die einen geringen Einfluß auf die basale Durchblutung der Nasenschleimhaut und ihre Sekretion haben, sowie den

Schwellungszustand kausal behandeln.

Die Erfindung

5 Mittels der die NO-Synthase hemmenden Mittel ist es möglich eine Abschwellung der Nasenschleimhaut und eine Unterdrückung der Nasensekretion zu erreichen. Die Wirkung des unter anderem in Sprayform applizierbaren Mittels kann über einen Zeitraum von mehr als 10 6 Stunden anhalten.

Diese Wirkungen konnten mit Hilfe der folgenden Substanzen aus der Gruppe der NO-Synthasehemmer (N-Nitro-L-Arginin und L-Aminoguanidin) an freiwilligen Probanden, die aufgrund entzündlicher bzw. allergischer Veränderungen eine Schwellung der Nasenschleimhaut und eine erhöhte Nasensekretion zeigten, getestet werden. Die Untersuchung erbrachte in allen Fällen mit solchen Affektionen der Nasenhöhle eine nach weniger als einer halben Stunde eintretende Abschwellung der Nasenschleimhaut, sowie eine weitgehende Reduktion der Sekretion. Diese Befunde wurden durch Inspektion der Nase vor der Applikation der Substanzen, sowie mehrere Stunden nach Applikation verifiziert. Darüberhinaus konnte bei den Probanden eine 20 rhinomonometrische Untersuchung angeschlossen werden, die eine deutliche Zunahme der Durchgängigkeit der Nase erkennen ließ. Die Untersuchungen wurden mit Substanzen durchgeführt, die sich hinsichtlich ihrer Spezifität gegenüber den Calcium-Calmodulinabhängigen Isoenzymen und dem nicht Calcium-Calmodulinabhängigen Isoenzym unterscheiden. Während das L-Nitroarginin bei allen Isoformen wirkt, zeigt das L-Aminoguanidin eine 1 : 40 stärkere Hemmung der induzierbaren nicht Calcium-Calmodulinabhängigen Isoform (Misko et al, 1993).

Die vorteilhafte Wirkung der Erfindung

Im Gegensatz zu den bisher verwendeten Mitteln zur Abschwellung der Nase und zur Unterdrückung der Nasensekretion führt eine Hemmung der NO-Bildung bei fehlender entzündlicher bzw. allergischer Affektion nicht zu einer Änderung des rhinomanometrisch meßbaren Luftstroms durch die Nase, wie unsere Ergebnisse an gesunden freiwilligen Testpersonen ergaben. Dies 45 spricht dafür, daß nur bei einer entzündlichen bzw. allergischen Veränderung in der Schleimhaut der Nase eine Wirkung erzielt wird, so daß keine Änderung der basalen physiologischen Durchblutung der Schleimhaut hervorgerufen wird. Dies stellt einen wesentlichen Vorteil gegenüber den bisher verwendeten Substanzen dar, die zu einer Erhöhung des rhinomanometrisch meßbaren Luftstroms auch unter basalen physiologischen Bedingungen führen. Die Erweiterung der Nase ist durch eine 50 Durchblutungsreduktion der Schleimhaut zu erklären. Dies beinhaltet bei Langzeitanwendung die Gefahr einer atrophischen Veränderung der Nasenschleimhaut. Die Anwendung von Substanzen, die die NO-Synthase hemmen bei entzündlichen und allergischen Veränderungen der Nasenschleimhaut läßt ein Fehlen dieser atrophischen Schleimhautaffektion erwarten. Darüberhinaus ist bei einer Applikation als Spray entsprechend den Befunden von Lundberg et al. 1995 nicht zu erwarten, daß es zu einer Beeinträchtigung der bakterioziden 55 Wirkung von NO in den Nasennebenhöhlen kommt.

- Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. (1993) Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J*; 6: 1368—1370.
- Baraniuk JN, Silver PB, Kaliner MA, Barnes PJ. (1994) Perennial rhinitis subjects have altered vascular, glandular, and neural responses to bradykinin nasal provocation. *Int Arch Allergy Immunol*; 103: 202—208.
- Cauna N, Cauna D. (1975) The fine structure and innervation of the cushion veins of the human nasal respiratory mucosa. *Anat rec*; 181: 1—15.
- Förstermann U, Schmidt HHHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane MM, Murad F. (1991) Isoforms of nitric oxide synthase characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol*; 42: 1849—57.
- Greiff L, Andersson M, Akerlund A, Wollmer P, Svensson C, Alkner U, Persson CGA. (1994) microvascular exudative hyperresponsiveness in human coronavirus-induced common cold. *Thorax*; 49: 121—127.
- Grevers G, Herrmann U. (1987) Das Schwellgewebe der Nasenschleimhaut. *Laryng Rhinol Otol*; 66: 152—156.
- Grevers G. (1993) The role of fenestrated vessels for the secretory process in the nasal mucosa. *Laryngoscope*; 103: 1255—1258.
- Grevers G. (1994) Lokalisationsspezifische, strukturelle und ultrastrukturelle Besonderheiten des endonasalen Schwellgewebes am Beispiel der unteren Nasenmuschel des Menschen. *Laryngo Rhino Otol*; 73: 46—50.
- Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, Bousquet J, Godard P, Holgate S, Polak JM. (1993) Induction of nitric oxide synthase in asthma.
- Hanazawa T, Motosugi H, Konno A, Kaneko T, Tanaka K, Chiba T. (1993) Distribution of NADPH-diaphorase positive nerve fibers in the rat nasal mucosa. *Neurosci Lett*; 159: 71—74.
- Kawabe T, Isobe KI, Hasegawa Y, Nakashima I, Shimokata K. (1992) Immunosuppressive activity induced by nitric oxide in culture supernatant of activated rat alveolar macrophages. *Immunology*; 76: 71—78.
- Kerwin JR, Heller M. (1994) The arginine-nitric oxide pathway: a target for new drugs. *Med Res Rev*; 14(1): 23—74.
- Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. (1994) Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*; 343: 133—35.
- Kim YC, Davies MG, Hagen PO, Carson CC. (1994) Experimental evidence for endothelium dependent relaxation and neuronal nitric oxide in corpus cavernosum. *Yonsei Med J*; 35(3): 308—13.
- Kishimoto J, Keverne EB, Hardwick J, Emson PC. (1993) Localization of nitric oxide synthase in the mouse olfactory and vomeronasal system: a histochemical, immunological and in situ hybridization study. *Eur J Neurosci*; 5: 1684—1694.
- Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. (1994) Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*; 343: 133—135.
- Knowles RG, Salter M, Brooks SL, Moncada S. (1990) anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. *Biochem Biophys Res Commun*; 172: 1042—48.
- Kulkarni AP, Getchell TV, Getchell ML. (1994) Neuro-

nal nitric oxide synthase is localized in extrinsic nerves regulating perireceptor processes in the chemosensory nasal mucosae of rats and humans. *J Comp Neuro*; 345: 125—138.

- Lundberg JON, Farkas-Szallasi T, Weitzberg E, Rinder J, Lidholm J, Ånggård A, Hökfelt T, Lundberg JM, Alving K. (1995) High nitric oxide production in human paranasal sinuses. *Nature medicine*; 1(4): 370—373.
- Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, McDaniel ML, Williamson JR, Currie MG. (1993) Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol*; 233: 119—125.
- Persson MG, Gustafsson LE. (1993) Allergen-induced airway obstruction in guineapigs is associated with changes in nitric oxide levels in exhaled air. *Acta Physiol Scand*; 149: 461—466.
- Persson MG, Wiklund NP, Gustafsson LE. (1993) Endogenous nitric oxide in single exhalations and the change during exercise. *Am Rev Respir Dis*; 148: 1210—14.
- Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, Lau KS, Michel T, Margraf LR, Star RA. (1994) Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchial epithelium. *J Clin Invest* 94: 2231—2236.
- Toda N, Kitamura Y, Okamura T. (1993) Neural mechanism of hypertension by nitric oxide synthase inhibitor in dogs. *Hypertension*, 21: 3—8.

Patentanspruch

"Verwendung der Stickstoffmonoxidsynthese hemmenden Substanzen der Gruppe der L-Argininanaloga (zu denen unter anderem N-Nitro-L-Arginin, N-Amino-L-arginin, N-Methyl-L-Arginin, N-Monomethyl-L-Arginin, N-Nitro-L-Arginin Methylester, N-Iminoethyl-L-Ornithin, gehören) zur Herstellung eines Mittels zur Abschwellung entzündlich bzw. allergisch angeschwollener Nasenschleimhaut und der Hemmung entzündlich und allergisch bedingter Nasensekretion."

— Einsatz der obengenannten Stickstoffmonoxidsynthese hemmenden Substanzen in einer Oberflächenapplikation.

— Einsatz von spezifischen L-Argininanaloga (zu denen unter anderem L-Aminoguanidin, gehören) zur Herstellung eines Mittels zur Abschwellung der Nasenschleimhaut und Hemmung der Nasensekretion durch selektive Hemmung der induzierbaren NO-Synthase.